Experimentelle Untersuchungen zur Blockierung des hyaluronidasehemmenden Effektes des Heparins und Histamins durch Ganglienblocker

von

JOSEF WINFRIED SEIDL

1962

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Experimentelle Untersuchungen zur Blockierung des hyaluronidasehemmenden Effektes des Heparins und Histamins durch Ganglienblocker

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Josef Winfried Seidl
aus
Scheyern/Obb.

1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München
Referent: Professor Dr. W. Seitz
Dekan: Professor Dr. ~~W. Seitz~~ A. Herrmann
Tag der mündlichen Prüfung: 8. 10. 1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

M e i n e n E l t e r n

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0078

Inhaltsverzeichnis

Problematik 6

Eigene Versuche 13

Methodik 13

Versuchsreihen 14

Statistische Auswertung 20

Diskussion 33

Zusammenfassung 35

Literaturverzeichnis 36

P r o b l e m a t i k

Hyaluronidasehemmung im Rahmen der Versuchsanordnung ist als Hemmung des durch Hyaluronidase geförderten Farbstoff-Spreadings zu verstehen. Unter Spreading versteht man die Ausbreitung eines intrakutan applizierten Farbstoffes. Von den Substanzen, die das Hyaluronidase-Spreading hemmen, sind in früheren Arbeiten vorwiegend antirheumatisch wirksame Substanzen untersucht worden [1 - 10].

Über die Wirkungsweise dieser Substanzen wurde festgestellt, daß sie nur in vivo spreadinghemmend wirksam sind, in vitro dagegen in üblichen Dosen größtenteils nicht die Hyaluronidaseaktivität hemmen [11]. Deshalb mußte ein Wirkungsmechanismus über körpereigene zwischengeschaltete Wirkstoffe (Fermente oder Hormone) angenommen werden.

An Substanzen wurden getestet: Salizylate [1,2], Phenylbutazon [3], Glucocorticoide [4], Chloraethylbenzmethoxazon [5], Östronsulfat [2], Nicopyron [6], Moorbäder [7,8], Schwefelbäder [9]. Ihre hyaluronidasehemmende Wirkung wurde bestätigt, bzw. nachgewiesen.

Mit einem großen Teil dieser Substanzen wurden die Versuche auch an adrenalektomierten und hypophysektomierten Tieren vorgenommen [1, 3-5, 8, 10, 12-14]. Dabei zeigte sich, daß die Hyaluronidasespreadinghemmung bei adrenalektomierten Tieren ausblieb, bei hypophysektomierten Tieren dagegen erhalten bleibt. Das bedeutet, daß die Nebenniere für die Hyaluronidasehemmung wichtig ist. Damit war noch nicht entschieden, ob die Rinde oder das Mark der wesentliche Anteil ist. Des-

halb wurde mit Hilfe des Sayers-Testes versucht, zunächst zu klären, welche Rolle die Rinde spielt. Mit diesem Test führte D o m e n j o z [15] Untersuchungen mit den Substanzen Salicylat, Phenylbutazon, Glucocorticoiden, M a t h i e s [13] mit Moorbädern durch. Dabei wurde festgestellt, daß der Ascorbinsäuregehalt der Nebenniere unter diesen geprüften Substanzen abnimmt, mit Ausnahme unter den Glucocorticoiden, weil ja das Hormon der Nebennierenrinde nicht die Nebennierenrinde aktiviert. Die anderen Substanzen bewirken eine Ascorbinsäureabnahme, womit nach S a y e r s und S a y e r s [16, 17] anzunehmen ist, daß die Nebennierenrinde stimuliert wird. Die Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes findet bei hypophysektomierten Tieren nicht statt [13, 15], obwohl nach Hypophysektomie die Hyaluronidasehemmung erhalten bleibt [1, 3-5, 8, 10,12-14]. Eine Rindenstimulierung ist also vorhanden, die aber nicht maßgebend für die Hyaluronidasehemmung ist. Dafür spricht ferner, daß auch Cortison bei adrenalektomierten Tieren keine Hyaluronidasehemmung bewirkt [4]. Daher muß das Nebennierenmark der Anteil sein, der für die Hyaluronidasehemmung eine Rolle spielt.

Um diese Annahme weiter zu unterbauen, haben M a t h i e s und Mitarbeiter [1, 2, 10, 14, 18, 19] die Nebennierenmarkhormone Adrenalin und Noradrenalin untersucht. Adrenalin und Noradrenalin haben eine hyaluronidasehemmende Wirkung in der Versuchsanordnung des Spreading. Diese hyaluronidasehemmende Wirkung ist in gleichen Dosen annähernd

gleich. Diese Wirkung ist auch bei adrenalektomierten Tieren vorhanden, wenn man die Nebennierenmarkhormone experimentell zuführt.

Ein weiterer Beweis, daß das Nebennierenmark eine Rolle spielt, ist, daß mit einem Ganglienblocker die spreading-hemmende Wirkung der untersuchten spreadinghemmenden Stoffe (Salicylate usw.) ausbleibt [20]. Die Ganglienblocker wirken blockierend auf das Nebennierenmark (E i c h h o l t z [21]), sie wirken aber auch auf periphere Ganglien. Eine periphere Hemmung kann jedoch nicht vorliegen, weil die Hyaluronidasehemmung des Adrenalin und Noradrenalin durch Ganglienblocker nicht aufgehoben wird [20].

Es wurden weiter Versuche durchgeführt, um den Einfluß der Adrenolytica wie Ergotamin und Regitin auf die Hyaluronidasehemmung zu klären [2, 22]. Diese Stoffe blockieren ebenfalls die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salicylate usw., blockieren aber auch die hyaluronidasehemmende Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin.

Man sah, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin erst auftritt, wenn die primäre Wirkung der Katecholamine abgeklungen ist [19]. Die primäre Katecholaminwirkung ist an der Pupillenweite sichtbar. Die Pupille erweitert sich rasch durch i.v.-Applikation von 1 γ Adrenalin, diese Wirkung ist nach 5 - 10 Minuten bereits vollständig wieder abgeklungen, eine maximale Hyaluronidasehemmung ist jedoch frühestens erst nach 15 Minuten erkennbar. Daraus ist zu schließen,

daß keine direkte Katecholaminwirkung vorliegen kann. Mehrere Möglichkeiten sind gegeben, wie diese indirekte Wirkung zustande kommt.

Es kann eine Gegenregulation im Vagussinne sein, das heißt, daß erst die Gegenregulation auf die Adrenalinwirkung die Hyaluronidasehemmung auslöst. Es müßte dann auch ein primär injizierter Vagusstoff bei adrenalektomierten Tieren die Hyaluronidasehemmung auslösen. Das ist jedoch nicht der Fall.

Wenn man bei adrenalektomierten Tieren 0,2 mg Acetylcholin/100 g (mit 1 γ Prostigmin/100 g als Cholinesterasehemmer) injiziert, so ergibt sich keine Hyaluronidasehemmung [23]. Die Annahme, daß die vagale Gegenregulation die Hyaluronidasehemmung auslöst, ist damit unwahrscheinlich.

Die zweite Möglichkeit ist, daß erst bei Rückkehr des Katecholamin-Blutspiegels auf normale Werte nach vorherigem Anstieg die Hyaluronidasehemmung ausgelöst wird. Dies konnte durch die Versuche von M a t h i e s und S c h l i e r f [24] bestätigt werden. Sie applizierten adrenalektomierten Tieren eine Adrenalin-Dauerinfusion über zwei Stunden und stellten fest, daß auch hier die Hyaluronidasehemmung erst in einem gewissen Zeitabstand nach Absetzen der Infusion auftritt. Wenn während dieser Dauerinfusion "Spitzen" einmaliger höherer Adrenalindosierungen gesetzt werden, tritt eine Hyaluronidasehemmung bereits während der Dauerinfusion im Anschluß an diese "Spitzen" auf. Es wird demnach angenommen, daß

eine Hyaluronidasehemmung immer dann sichtbar wird, wenn ein höherer Adrenalin-Blutspiegel auf ein niedrigeres Niveau absinkt. Weiter ist die Versuchsanordnung ein Beweis dafür, daß die Katecholaminabbauprodukte nicht maßgebend sein können, weil diese in zwei Stunden ausreichend vorhanden sind.

Es bleibt die Feststellung, daß das Absinken des Katecholamin-Blutspiegels von einem höheren auf ein niedrigeres Niveau die Hyaluronidasehemmung auslöst.

Weiterhin wurde durch Versuche mit dem Monaminoxydasehemmer Iproniacid nachgewiesen [25], daß auch das Absinken des Katecholamin-Blutspiegels unter das Normalniveau hyaluronidasehemmend wirksam ist. Das bedeutet, daß jegliches Absinken des Katecholamin-Blutspiegels in jedem Falle eine Hyaluronidasehemmung auslöst. Die Mindestdifferenz muß 1 γ Adrenalin pro 100 g Tier als Minimum betragen [19].

Diese durch Iproniacid hervorgerufene Hemmung wird weder durch Ganglienblocker noch durch Adrenolytica aufgehoben [25]. Das heißt, daß die Monaminoxydasehemmer ein Absinken des Blutspiegels bewirken, das nicht durch vorherige Steigerung durch eine Nebennierenmarkstimulierung erfolgt sein kann. Sonst hätte man mit einem Ganglienblocker, wie auch mit Ergotamin diesen Vorgang blockieren können. Eine Möglichkeit, daß Iproniacid über eine Steigerung des Katecholamin-Blutspiegels gewirkt hätte, ohne daß das Nebennierenmark aktiviert worden wäre, wäre höchstens durch Hemmung des Adrenalinabbaus denkbar.

Monaminoxydasehemmer sind Stoffe, die den Abbau von Adrenalin und Noradrenalin hemmen. Eine hemmende Wirkung auf den Metabolismus in der Blutbahn ist jedoch nicht anzunehmen [25], weil die Hyaluronidasehemmung verzögert sein müßte, wenn man Adrenalin unter Iproniacid-Einfluß injiziert. Also kann die hyaluronidasehemmende Wirkung des Iproniacid nicht durch vorherige Erhöhung zustande kommen.
Das deckt sich mit den bisher bekannten Befunden, daß Iproniacid eine Ansammlung von Adrenalin und Noradrenalin im Gewebe und damit speziell eine Ansammlung von Katecholamin im Nebennierenmark bedingt und deren Ausschüttung hemmt [26]; das heißt: die normale Sekretion wird vermindert, dadurch sinkt entsprechend der Blutspiegel.

Mit Sicherheit ist anzunehmen, daß ein weiterer Faktor im Anschluß an das Absinken des Katecholamin-Blutspiegels zwischengeschaltet ist, der die Hyaluronidasehemmung auslöst. Es war zu untersuchen, welche körpereigenen Substanzen hier in Betracht kommen.
Es kommt das Heparin in Frage, das körpereigen ist und eine Hyaluronidasehemmung auch in vitro auslöst [11]. Deshalb ist es möglich, daß Heparin das Endglied dieser Wirkungskette ist. Aus früheren Untersuchungen mit Heparin ergibt sich, daß Heparin bereits in geringen Dosen (1,5 I.E. pro 100 g Tier) die Hyaluronidase hemmt [27, 28]. Diese Hyaluronidasehemmung ist mit

Protaminsulfat aufzuheben [27, 29]. Protaminsulfat ist eine heparininaktivierende Substanz. Die Heparin-Dosis von 15 I.E. liegt an der unteren Grenze der Menge, die überhaupt noch Einfluß auf die Gerinnung hat (H a r - d e g g und M a s s [30]). Deshalb handelt es sich um eine Wirkung, die nicht mit der Gerinnungswirkung des Heparins im Zusammenhang steht. Protaminsulfat blockiert die Hyaluronidasehemmung von Adrenalin und Noradrenalin[29,31] und auch die Hyaluronidasehemmung der geprüften antirheumatischen Substanzen [27, 32-34].

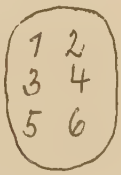
Die Hyaluronidasehemmung des Heparins wird anscheinend durch Adrenolytica nur vermindert [29], weshalb die Stellung des Heparins im Wirkungsablauf der hyaluronidasehemmenden Substanzen weiter erhärtet werden muß. Dazu erschienen Versuche mit Ganglienblocker erforderlich. Das Heparin befindet sich in den Mastzellen [35, 36] und ist dort chemisch durch SO_3H - Gruppen an Histamin gebunden [37]. Deshalb wurden auch mit Histamin Versuche durchgeführt. Auch Histamin i.v. hemmt schon in sehr geringen Dosen die Hyaluronidaseaktivität [38, 39]. Diese Hemmung wird z.B. durch das Antihistaminicum Avil aufgehoben [39]. Avil blockiert gleichzeitig die Hyaluronidasehemmung der hyaluronidasehemmenden Substanzen [40] und des Adrenalin [39]. Ergotamin als Adrenalyticum blokkiert ebenfalls die Hyaluronidasehemmung des Histamins[39]. Auch im Falle des Histamins war die Beeinflussung seines hyaluronidasehemmenden Effektes durch Ganglienblocker zu untersuchen.

Eigene Versuche

Methodik

Es wurden männliche, weiße Ratten im Gewicht von 150-200 g verwendet. Die Hyaluronidasehemmung wurde mit Hilfe des Spreadingtestes gemessen und errechnet. Die Versuche wurden in Evipan-Narkose durchgeführt (30 mg Evipan-Natrium pro 100 g Tier subcutan), wobei nach W i l h e l m i [41] kein störender Einfluß auf die Hyaluronidaseaktivität entsteht. Es wurden zunächst intracutan je eine Farbstoff-Quaddel (Fv) mit 0,1 ccm einer 0,06 %igen Evansblaulösung und eine Farbstoff- + Hyaluronidasequaddel (FHv) mit zusätzlich 7,5 I.E. Hyaluronidase gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff- + Hyaluronidasequaddel wurde eine Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin), enthaltend 150 I.E., in 2 ccm der obengenannten 0,06 %igen Evansblaulösung gelöst, so daß bei der Injektion von 0,1 ccm 7,5 I.E. zur Wirkung kamen. Das Setzen der Quaddeln erfolgte streng intracutan mit einer dünnen Kanüle in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut. 10 Minuten nach der Injektion wurde die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff- sowie der Farbstoff- + Hyaluronidasequaddel an der erreichten Ausbreitung registriert, indem die Konturen mittels eines Farbstifts nachgezeichnet, auf einen Filmstreifen übertragen und planimetrisch ausgemessen wurden. Zwei weitere Quaddelpaare (F_1, FH_1; F_2, FH_2) der obengenannten Lösungen wurden zu verschiedenen Zeiten nach i.v. Injektion der auf ihre Hyaluronidasehemmung zu prüfenden Substanzen gesetzt und ebenfalls nach 10 Minuten abgelesen.

Um etwaige Einflüsse der Lokalisation der Quaddeln auf der Bauchhaut der Versuchstiere auf das Ergebnis der Versuche auszuschalten, wurden die Versuche im "Lateinischen Quadrat" durchgeführt. Hierbei wird die Bauchhaut jedes Versuchstieres als ein Versuchsfeld mit 6 verschiedenen "Lokalisationen" angesehen. Insgesamt werden in jeder Versuchsreihe 6 Versuchstiere herangezogen; jedes Verfahren wird bei den einzelnen Tieren in der Weise anders lokalisiert, daß insgesamt bei den 6 Tieren jedes Verfahren in zufälliger Anordnung einmal bei jeder der 6 möglichen Lokalisationen angewandt wurde.



Schema der Lokalisationsmöglichkeiten

Versuchsreihe 1

Es wurden bei intakten Ratten zunächst reine Farbstoffquaddeln und Farbstoff- + Hyaluronidasequaddeln gesetzt und deren Ausbreitung nach Ablauf von 10 Minuten gemessen. 10 Minuten nach Setzen der ersten Quaddeln wurden 15 I.E. pro 100 g Tier Heparin (Liquemin) i.v. injiziert. Es wurden nach weiteren 10 bzw. 25 Minuten erneut Quaddelpaare gesetzt und nach 10 Minuten abgelesen.

Tiere	Lokalisation 1	2	3	4	5	6
1	FH_1	F_2	F_v	FH_v	F_1	FH_2
2	FH_2	F_v	F_1	F_2	FH_1	FH_v
3	FH_v	F_1	FH_1	F_v	FH_2	F_2
4	F_2	FH_1	FH_2	F_1	FH_v	F_v
5	F_v	FH_2	FH_v	FH_1	F_2	F_1
6	F_1	FH_v	F_2	FH_2	F_v	FH_1

Lokalisationsschema

Tier Nr.	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel
	vor		10 Min. nach		25 Min. nach	
	15 I.E. Heparin pro 100 g i.v.					
1	130	210	118	180	106	159
2	132	211	113	184	100	170
3	127	208	120	160	100	140
4	134	204	117	190	96	169
5	123	220	100	170	93	157
6	130	214	110	167	100	140

Ergebnisse in Einzelwerten

Tabelle 1

(Versuchsreihe 1)

Versuchsreihe 2

10 Minuten nach Setzen des ersten Quaddelpaares wurde der Ganglienblocker Pendiomid intravenös in die Vena femoralis injiziert (5 mg pro 100 g Tier). Nach 30 Minuten wurde Heparin (Liquemin) intravenös gegeben (15 I.E. pro 100 g Tier). Nach weiteren 10 und 25 Minuten wurden an den gesetzten Quaddelpaaren die Werte abgenommen.

Versuchsreihe 3

Nach dem Setzen und Ablesen der ersten reinen Farbstoff- und Farbstoff- + Hyaluronidasequaddeln wurde Histamin intravenös injiziert (1,5 γ pro 100 g Tier). Nach 40 und 48 Minuten wurden weitere Quaddelpaare gesetzt und 10 Minuten später abgelesen.

Versuchsreihe 4

Nach Setzen und Ablesen der ersten reinen Farbstoff- und Farbstoff- + Hyaluronidasequaddeln wurde der Ganglienblocker Pendiomid intravenös injiziert (5 mg pro 100 g Tier). Nach 30 Minuten wurde Histamin intravenös gegeben (1,5 γ pro 100 g Tier). Nach weiteren 40 und 48 Minuten wurden weitere Quaddelpaare gesetzt und 10 Minuten danach abgelesen.

Tiere	Lokalisation 1	2	3	4	5	6
1	F_1	F_2	FH_1	FH_2	F_v	FH_v
2	F_2	FH_1	FH_v	F_1	FH_2	F_v
3	FH_1	FH_v	F_v	F_2	F_1	FH_2
4	FH_v	F_v	FH_2	FH_1	F_2	F_1
5	F_v	FH_2	F_1	FH_v	FH_1	F_2
6	FH_2	F_1	F_2	F_v	FH_v	FH_1

Lokalisationsschema

Tier Nr.	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel
	vor		10 Min. nach		25 Min. nach	
	15 I.E. Heparin/100 g i.v.; dieses 30 Min. nach 5 mg Pendiomid/100 g i.v.					
1	126	208	128	203	119	200
2	124	212	122	200	123	202
3	120	213	124	201	122	203
4	126	213	127	214	128	207
5	130	201	125	190	128	200
6	127	211	125	200	126	209

Ergebnisse in Einzelwerten

Tabelle 2

(Versuchsreihe 2)

Tiere	Lokalisation 1	2	3	4	5	6
1	FH_2	FH_1	F_2	FH_v	F_v	F_1
2	F_v	FH_v	F_1	FH_2	F_2	FH_1
3	F_2	FH_2	FH_1	F_v	F_1	FH_v
4	F_1	F_v	FH_v	F_2	FH_1	FH_2
5	FH_1	F_2	FH_2	F_1	FH_v	F_v
6	FH_v	F_1	F_v	FH_1	FH_2	F_2

Lokalisationsschema

Tier Nr.	Farbstoffquaddel vor	Hy'asequaddel vor	Farbstoffquaddel 10 Min. nach	Hy'asequaddel 10 Min. nach	Farbstoffquaddel 25 Min. nach	Hy'asequaddel 25 Min. nach
	1,5 γ Histamin pro 100 g i.v.					
1	130	236	107	170	98	158
2	128	229	109	169	95	160
3	140	240	105	172	95	172
4	140	239	107	175	94	168
5	135	226	119	160	98	155
6	138	230	116	168	100	143

Ergebnisse in Einzelwerten

Tabelle 3

(Versuchsreihe 3)

Tiere	Lokalisation 1	2	3	4	5	6
1	FH_v	FH_2	F_2	FH_1	F_1	F_v
2	F_1	FH_1	FH_2	F_v	F_2	FH_v
3	F_2	F_v	FH_1	FH_v	FH_2	F_1
4	FH_2	FH_v	F_v	F_1	FH_1	F_2
5	FH_1	F_1	FH_v	F_2	F_v	FH_2
6	F_v	F_2	F_1	FH_2	FH_v	FH_1

Lokalisationsschema

Tier Nr.	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	Hy'ase-quaddel
	vor		40 Min. nach		48 Min. nach	
	1,5 γ Histamin/100 g i.v.; dieses 30 Min. nach 5 mg Pendiomid/100 g i.v.					
1	123	217	110	194	120	225
2	137	231	133	230	135	230
3	130	224	118	203	115	207
4	127	227	122	200	125	228
5	124	221	128	220	125	229
6	130	225	110	220	120	200

Ergebnisse in Einzelwerten

Tabelle 4

(Versuchsreihe 4)

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistisches Modell und Methodik

Primäre Aufgabe der statistischen Auswertung von Versuchsergebnissen ist es, eine Schätzung für die experimentelle Variabilität zu ermitteln. Hierzu ist es notwendig, aus der Gesamt-Variabilität der Versuchsergebnisse diejenigen Anteile zu eliminieren, die durch systematische Faktoren bedingt sind.

Bei den hier vorliegenden Versuchen war primär an folgende systematische Faktoren zu denken:

Individuelles Reaktionsniveau der Versuchstiere,

Unterschiede in der Wirkung der 6 Verfahren,

Unterschiede im Einfluß der Lokalisationen.

Zur Ermittlung des Anteiles, den diese systematischen Faktoren an der Gesamt-Variabilität haben, diente eine mehrfache Varianz-Analyse. Dieser Varianz-Analyse liegt ein lineares statistisches Modell zugrunde, bei dem angenommen wird, daß sich die einzelnen systematischen Faktoren unabhängig in additiver Weise überlagern. Jedem einzelnen systematischen Faktor entspricht in der Varianz-Analyse eine"Varianz-Komponente", die ein Maß für die Wirkung dieses Faktors darstellt. Darüber hinaus liefert die Varianz-Analyse in Form der "Rest-Varianz" eine optimale Schätzung für die experimentelle Variabilität; darunter ist derjenige Anteil der Gesamt-Variabilität zu verstehen, der nicht mehr durch den Einfluß systematischer Faktoren erklärbar ist.

Eine statistisch gesicherte Wirkung eines systematischen Faktors liegt nur dann vor, wenn seine zugehörige Varianz-Komponente statistisch gesichert größer ist als die experimentelle Variabilität, d.h. die Rest-Varianz. Ob dies der Fall ist, wird mit Hilfe des Varianz-Quotienten-Tests (F-Test) geprüft; hierbei wird die jeweilige Varianz-Komponente mit der Rest-Varianz verglichen.

Entsprechend der Fragestellung, welche den Versuchen zugrunde lag, interessierten wir uns primär für den Unterschied in der Wirkung verschiedener "Verfahren". Hier ist zunächst der generelle Unterschied in der Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Quaddeltypen zu berücksichtigen; außerdem war für jeden Quaddel-Typus einzeln zu untersuchen, ob zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten zu den "Versuchs-Zeiten" und der "Kontrolle" statistisch gesicherte Unterschiede bestehen, schließlich war noch zu prüfen, ob zwischen den"Versuchszeiten"selber auch noch statistisch gesicherte Unterschiede vorliegen. Für die statistische Untersuchung dieser Fragen führten wir einen "orthogonalen Vergleich" durch, bei dem die Varianz-Komponente, die zu den Verfahren gehört, in 5 "orthogonale Komponenten" zerlegt wird. Jede dieser orthogonalen Komponenten gehört zu einer der oben angegebenen Fragestellung; für die Beurteilung der Versuchsergebnisse sind primär von Interesse die Komponenten "zwischen Kontrolle und Versuchszeiten" und "zwischen Versuchszeiten". Diese orthogonalen Komponenten werden wiederum mit Hilfe des F-Tests mit der experimentellen Variabilität verglichen;

nur wenn sie statistisch gesichert größer sind als die experimentelle Variabilität, kann behauptet werden, daß zwischen den verglichenen Verfahren statistisch gesicherte Unterschiede vorliegen.

Das lineare statistische Modell und somit die Varianz-Analysen gestatten es nicht, die absolute Wirksamkeit eines "Verfahrens" zu ermitteln. Lediglich die Unterschiede zwischen je zwei verschiedenen Verfahren lassen eine statistische Schätzung zu. Hierzu wird folgendermaßen vorgegangen. Es bedeutet $\bar{x}$ (V) das arithmetische Mittel aus allen Meßwerten, die für ein bestimmtes Verfahren V an den 6 Versuchstieren beobachtet wurden. Dann ist die Differenz zwischen den arithmetischen Mitteln, die zu zwei verschiedenen Verfahren gehören, eine optimale statistische Schätzung für den Unterschied in der Wirkung dieser beiden Verfahren, gemessen an der Diffusionsgeschwindigkeit der zugehörigen Quaddeln.

Für die Fragestellung, die den Versuchen zugrunde lag, interessierte primär die Differenz in der Wirksamkeit der "Versuchszeiten" gegenüber den "Kontrollen". Dem Unterschied zwischen diesen "Verfahren" entspricht die Mittelwertsdifferenz

$$\delta\, \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K);$$

hierin bedeutet $\bar{x}(t)$ das arithmetische Mittel, welches zu einer Versuchszeit gehört, $\bar{x}(K)$ das arithmetische Mittel, das zur "Kontrolle" gehört. Die statistische Analyse läuft im Prinzip darauf hinaus zu prüfen, ob diese Mittelwertsdifferenzen $\delta\bar{x}(t)$ statistisch gesichert von 0 verschieden

sind. Dabei wird von einer "statistischen Sicherung" gesprochen, wenn die Aussage, eine Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ sei von 0 verschieden, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit belastet ist, die kleiner ist als 5 %. Von einer ausreichenden statistischen Sicherung kann allerdings erst die Rede sein, wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % ist.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

In den Tabellen 5 - 8 sind zunächst die Ergebnisse der Varianz-Analysen für die einzelnen Versuchsreihen angegeben. Es bedeutet in diesen Schemata

- n: die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
- SAQ: das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- MAQ: das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- $F_{emp.}$: den Varianz-Quotienten zwischen der Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz);
- p: die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{emp.}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

In den Tabellen 9 - 12 sind zunächst die Mittelwerte $\bar{x}(V)$ für die einzelnen Verfahren angegeben, außerdem die Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K)$. In der Spalte "Sicherung" wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit angeführt,

mit der behauptet werden kann, eine Mittelwertsdifferenz $\delta\bar{x}(t)$ sei von 0 verschieden; allerdings wurde diese Irrtumswahrscheinlichkeit nur aufgeführt, wenn sie nicht größer als 5 % war. Die Größe dieser Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit Hilfe des oben beschriebenen orthogonalen Vergleiches ermittelt. In der Spalte "Hemmung" ist schließlich noch die in üblicher Weise errechnete prozentuale Hyaluronidase-Hemmung angegeben.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Versuchsreihe 1: In dieser Versuchsreihe liegt sowohl für die reine Farbstoff-Quaddel als auch für die Farbstoff- + Hyaluronidase-Quaddel eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit nach Applikation der Prüfsubstanz vor (Irrtumswahrscheinlichkeit in jedem Falle kleiner als 1 %). Aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenzen $\delta\bar{x}(t)$ ergibt sich, daß es sich hierbei um eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeiten beider Quaddel-Typen handelt, die bei der Farbstoff- + Hyaluronidase-Quaddel annähernd doppelt so groß ist als bei der reinen Farbstoff-Quaddel. Für beide Quaddel-Typen unterscheiden sich außerdem noch die Diffusionsgeschwindigkeiten zu den zwei "Versuchszeiten" in statistisch gesicherter Weise.

Versuchsreihe 2: Hier liegt nur für die Farbstoff- + Hyaluronidase-Quaddel eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit vor. Das Vorzeichen der

Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ zeigt wieder, daß es sich hierbei um eine Hemmung in der Ausbreitung der Farbstoff- + Hyaluronidase-Quaddel handelt. Ein Vergleich der Mittelwertsdifferenzen dieser Versuchsreihe mit denjenigen der Versuchsreihe 1 zeigt, daß durch die vorangehende Applikation von Pendiomid die hyaluronidasehemmende Aktivität des Heparins wesentlich reduziert worden ist.

Versuchsreihe 3: Bei dieser Versuchsreihe liegt sowohl für die reine Farbstoff-Quaddel als auch für die Farbstoff- + Hyaluronidase-Quaddel eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit nach Applikation von Histamin gegenüber den Kontroll-Quaddeln vor (Irrtumswahrscheinlichkeit in jedem Falle kleiner als 0,1 %). Es handelt sich hierbei jeweils um eine Reduzierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der beiden Quaddel-Typen, die sich aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ ergibt. Für jeden der beiden Quaddel-Typen liegt außerdem ein statistisch gesicherter Unterschied in der Diffusionsgeschwindigkeit zu den beiden Versuchszeiten vor.

Versuchsreihe 4: Diese Versuchsreihe führt praktisch zu dem gleichen Ergebnis wie die Versuchsreihe 2; es läßt sich eine statistisch gesicherte Hemmung in der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Farbstoff- + Hyaluronidase-Quaddel nachweisen, die jedoch wesentlich kleiner ist als bei alleiniger Applikation von Histamin. Die reine Farbstoff-Quaddel dagegen zeigt keine statistisch faßbaren

Veränderungen ihrer Diffusionsgeschwindigkeit.

Ein statistisch faßbarer Einfluß der Lokalisationen auf die Versuchsergebnisse läßt sich nur in der Versuchsreihe 3 nachweisen. Ob es sich hierbei um ein andersartiges Verhalten unter Histamin handelt oder ob dieser Effekt nur rein zufällig aufgetreten ist, ließe sich erst durch weitere Untersuchungen klären. Das Ziel des Versuchsplanes war primär jedoch nicht, eine Kenntnis über etwaige Einflüsse der Lokalisationen zu gewinnen. Vielmehr sollte durch Berücksichtigung möglichst vieler systematischer Faktoren eine möglichst genaue Schätzung der experimentellen Variabilität erreicht werden. Dieses Ziel wurde erreicht, da bei allen Versuchsreihen die Rest-Varianz, d.h. die Schätzung der experimentellen Variabilität, außerordentlich klein ist.

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	587	117	1°98	-
Zw.Lokalisationen	5	349	70	1°19	-
Zwischen Verfahren	5	52.467	10.493	100°00	0°1 %
Zw.Quaddel-Typen	1	40.267	40.267	100°00	0°1 %
Zw.Kontr.u.V.-Zeit. (Farbstoff)	1	2.162	2.162	36°64	0°1 %
Zw.Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	574	574	9°73	1 %
Zw.Kontr.u.V.-Zeit (Hy'ase)	1	8.342	8.342	100°00	0°1 %
Zw.Versuchs-Zeiten (Hy'ase)	1	1.121	1.121	19°00	0°1 %
Rest-Varianz	20	1.184	59		
Gesamt-Varianz	35	54.587	1.560		

T a b e l l e 5

(Varianzanalysen Versuchsreihe 1)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	245	49	1°69	-
Zw.Lokalisationen	5	101	20	-	
Zwischen Verfahren	5	56.874	11.375	100°00	0°1 %
Zwischen Quaddel-Typen	1	56.565	56.565	100°00	0°1 %
Zw.Kontr.u.V.-Zeit. (Farbstoff)	1	2	2	-	
Zw.Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	2	2	-	
Zw.Kontr.u.V.-Zeit. (Hy'ase)	1	261	261	9°00	1 %
Zw.Versuchs-Zeiten (Hy'ase)	1	44	44	1:52	-
Rest-Varianz	20	580	29		
Gesamt-Varianz	35	57.800	1.651		

T a b e l l e 6

(Varianzanalysen Versuchsreihe 2)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	197	39	1°44	-
Zw.Lokalisationen	5	410	82	3°04	5 %
Zwischen Verfahren	5	72.088	14.418	100°00	0°1 %
Zw.Quaddel-Typen	1	48.107	48.107	100°00	0°1 %
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	3.990	3.990	100°00	0°1 %
Zw.Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	574	574	21°26	0°1 %
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten (Hy'ase)	1	19.136	19.136	100°00	0°1 %
Zw.Versuchs-Zeiten (Hy'ase)	1	280	280	10°37	1 %
Rest-Varianz	20	531	27		
Gesamt-Varianz	35	73.226	2.092		

T a b e l l e 7

(Varianzanalysen Versuchsreihe 3)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	1.255	251	5°02	1 %
Zw.Lokalisationen	5	474	95	1°90	-
Zwischen Verfahren	5	79.031	15.806	100°00	0°1 %
Zw.Quaddel-Typen	1	78.307	78.307	100°00	0°1 %
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten (Farbstoff)	1	182	182	3°64	-
Zw.Versuchs-Zeiten (Farbstoff)	1	30	30	-	
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten (Hy'ase)	1	427	427	8°54	1 %
Zw.Versuchs-Zeiten (Hy'ase)	1	85	85	1°70	-
Rest-Varianz	20	994	50		
Gesamt-Varianz	35	81.754	2.336		

T a b e l l e 8

(Varianzanalysen Versuchsreihe 4)

	$\bar{x}$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t)-\bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_v	129	15			
$F_{10'}$	113	54	-16		1 %
$F_{25'}$	99	19	-30		0°1 %
FH_v	211	30			
$FH_{10'}$	175	129	-36	37°0	0°1 %
$FH_{25'}$	156	177	-55	56°8	0°1 %

Tabelle 9

(Mittelwerte, Mittelwertsdifferenzen und Irrtumswahrscheinlichkeiten Versuchsreihe 1)

	$\bar{x}$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t)-\bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_v	125	11			
$F_{10'}$	125	5	0		-
$F_{25'}$	124	13	-1		-
FH_v	210	21			
$FH_{10'}$	200	121	-10	11°8	1 %
$FH_{25'}$	203	14	-7	7°3	5 %

Tabelle 10

(Mittelwerte, Mittelwertsdifferenzen und Irrtumswahrscheinlichkeiten Versuchsreihe 2)

	$\bar{x}$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t)-\bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	135	27			
$F_{40'}$	110	32	-25		0°1 %
$F_{48'}$	97	5	-38		0°1 %
FH_V	233	33			
$FH_{40'}$	169	26	-64	54°0	0°1 %
$FH_{48'}$	159	105	-74	62°1	0°1 %

Tabelle 11

(Mittelwerte, Mittelwertsdifferenzen und Irrtumswahrscheinlichkeiten Versuchsreihe 3)

	$\bar{x}$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t)-\bar{x}(K)$	Hemmung	Sicherung
F_V	128	26			
$F_{40'}$	120	88	-8		-
$F_{48'}$	123	47	-5		-
FH_V	224	23			
$FH_{40'}$	211	199	-13	13°0	0°1 %
$FH_{48'}$	216	161	-8	7°6	-

Tabelle 12

(Mittelwerte, Mittelwertsdifferenzen und Irrtumswahrscheinlichkeiten Versuchsreihe 4)

Diskussion

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 1 zeigen die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins, wie sie bereits von Maxein [27] und Terhardt [28] mit der gleichen Versuchsanordnung gefunden wurden. Bei vorheriger Gabe des Ganglienblockers Pendiomid wird nach den Ergebnissen von Versuchsreihe 2 die hyaluronidasehemmende Eigenschaft des Heparins weitgehend aufgehoben. Wenn nach Durchführung der oben genannten Untersuchungen von Mathies und Mitarbeitern vermutet wurde, daß das Heparin im Anschluß an ein Absinken des Katecholamin-Blutspiegels nach vorheriger Erhöhung durch Freisetzung aus dem Nebennierenmark hyaluronidasehemmend wirksam wird, so lassen die Ergebnisse in dieser Arbeit Zweifel an dieser Annahme aufkommen. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß Ganglienblocker im Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen nur blockierend auf das Nebennierenmark einwirken. Damit wird eine über das Nebennierenmark laufende Wirkung auch des Heparins hinsichtlich seines hyaluronidasehemmenden Effektes wahrscheinlich. Gegen eine solche Annahme sprechen jedoch wiederum die eingangs erwähnten Versuchsergebnisse, nach denen Adrenolytica die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins nicht aufzuheben imstande sind. Damit bedürfen diese letztgenannten Untersuchungen einer Nachprüfung, bevor weitere Überlegungen angestellt werden.

Eindeutig scheinen die Verhältnisse beim Histamin zu liegen, dessen hyaluronidasehemmender Effekt durch Ergotamintartrat weitgehend reduziert wird. In der Versuchsreihe 3 konnten wir die hyaluronidasehemmende Wirkung des Histamins, die M e d e r [38] bereits nachwies, bestätigen. Nach den Ergebnissen der Versuchsreihe 4 wird dieser Effekt durch den Ganglienblocker Pendiomid blockiert. Damit erscheint eine über das Nebennierenmark laufende Wirkung der Hyaluronidasehemmung durch Histamin wahrscheinlich. Eine etwaige Stellung des Histamins im Wirkungsablauf der geprüften hyaluronidasehemmenden Stoffe (Salicylate usw.) zeichnet sich damit jedoch noch nicht eindeutig ab, sie ist aber nach wie vor zu diskutieren, da Avil als Antihistaminicum nicht nur die hyaluronidasehemmende Wirkung des Histamins, sondern auch die der hyaluronidasehemmenden antirheumatischen Substanzen aufhebt. Es ergeben sich jedoch auch hier Schwierigkeiten einer Erklärung insofern, als die hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalin, wie erwähnt, ebenfalls durch Avil aufgehoben wird. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß ein direkter Weg von den untersuchten antirheumatischen Substanzen über eine Histaminfreisetzung zu einer Aktivierung des Nebennierenmarks mit Freisetzung von Katecholaminen führt. Wenn das Histamin am Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Stoffe überhaupt beteiligt ist, würden vorerst nicht übersehbare Wechselwirkungen vorliegen, wie sie im tierischen Organismus selbstverständlich prinzipiell möglich erscheinen.

Zusammenfassung

Es wurde die hyaluronidasehemmende Wirkung sowohl des Heparins wie des Histamins im Tierversuch bestätigt. Sie wird durch den Ganglienblocker Pendiomid weitgehend aufgehoben. Die mögliche Bedeutung des Heparins und Histamins im Ablauf des Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Substanzen wurde diskutiert.

Literaturverzeichnis

1) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35,892 (1957)

2) Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J. u. Schmidt, D.: Med. Exp. 1, 64 (1959)

3) Mathies, H., Biechele, I. u. Hartmann, M.: Ärztl.Forsch. 14, 160 (1960)

4) Mathies, H.: Zschr. ges. exp. Med. 131, 118 (1959)

5) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Arzneimittelforsch. 9, 576 (1959)

6) Mathies, H., Batisweiler, T., Kreiselmeier, G. u. Will, E.: Arzneimittelforsch. 10, 484 (1960)

7) Mathies, H.: Med. Wschr. 10, 685 (1958)

8) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. f. angew. Bäder- u. Klimaheilk. 5, 503 (1958)

9) Mathies, H. u. Gareißen, G.: Med. Kl. 5, 190 (1960)

10) Mathies, H.: Pharmazie, 8, 429 (1959)

11) Pantlitschko, M. u. Kaiser, E.: Biochem.Zschr. 322, 137 (1951)

12) Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)

13) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)

14) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)

15) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225, 14 (1955)

16) Sayers, G. u. Sayers, M.: Endocrinology 40, 256 (1947)

17) Sayers, G. u. Sayers, M.: Ann.N.Y.Acad.Sci.50, 522 (1949)

18) Mathies, H.: Ärztl. Forsch. 12, 87 (1958)

19) Mathies, H.: Arch.int.pharmacodyn. CXXIII (1960)

20) Mathies, H., Oestreich, G. u. Schwalbach, K.:
in Vorbereitung

21) Eichholtz, F.: Lehrbuch der Pharmakologie, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg, 80 (1957)

22) Schmidt, D.: Diss. München, in Vorbereitung

23) Schlierf, G.: Diss. München (1959)

24) Mathies, H. u. Schlierf, G.: Med. exp. 2, 333 (1960)

25) Mathies, H.: in Vorbereitung

26) Pletschen, A.: Experientia 14, 73 (1958)

27) Maxein, H.: Diss. München (1959)

28) Terhardt, F.: Diss. München, in Vorbereitung

29) Christoforis, A.: Diss. München, in Vorbereitung

30) Hardegg, W. u. Mass, W.: Klin.Wschr. 33, 811 (1955)

31) Weiss, G.: Diss. München, in Vorbereitung

32) Glück, A.: Diss. München (1959)

33) Poulantzas, J.: Diss. München (1959)

34) Vogel, M.: Diss. München, in Vorbereitung

35) Riley, J.F. u. West, G. B.:Fed.Proc.11, 350 (1952)

36) Werle, E. u. Amann, R.: Naturwissensch.42, 583 (1955)

37) Sanyal, R.K. u. West, G.B.: Nature (London), 1293 (1956)

38) Meder, H.: Diss. München, in Vorbereitung

39) Kontis, N.: Diss. München (1960)

40) Ahlheim, G.: Diss. München (1960)

41) Wilhelmi, G.: Zit. Domenjoz [15]

Herrn Professor Dr. W. Seitz möchte ich für die Überlassung des Themas und Übernahme des Referates danken.

Herrn Dr. H. Mathies danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Ratschläge während der Versuche und während der Abfassung der Arbeit. Herrn Dipl.-Math.K.Liebrich danke ich für die Bearbeitung der statistischen Auswertung.

L e b e n s l a u f

Am 23. April 1937 wurde ich in München geboren. Von 1943-1947 besuchte ich die Volksschule in Scheyern. Von 1947-1956 war ich Schüler des Humanistischen Gymnasiums Scheyern, wo ich im Juli 1956 die Reifeprüfung ablegte. Im November 1956 begann ich das Studium der Medizin in München. Sämtliche Semester verbrachte ich an der Universität München. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1959, die ärztliche Staatsprüfung am 7.8.1962.